

THESIS

MARBURG

1969

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. W. Löhr

Über die Haltbarkeit der Plasmalipide unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Ortrun Mühlfellner, geb. Kempin
aus Günzburg

Marburg/Lahn 1969

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. W. Löhr

Über die Haltbarkeit der Plasmalipide unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Ortrun Mühlfellner, geb. Kempin
aus Günzburg

Marburg/Lahn 1969

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 2. 6. 1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson
Referent: Prof. Dr. med. G. W. Löhr
Correferent: Priv. Doz. Dr. med. H. Kaffarnik

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung und Fragestellung	1
B. Methodik	3
1. Probanden	3
2. Blutentnahme	3
3. Lagerung	3
4. Durchgeführte Bestimmungen	3
5. Blutprobenverarbeitung	4
a) Gesamtcholesterin	4
b) Freies Cholesterin	7
c) Extraktion der Lipide	10
d) Triglyceride	10
e) Phosphatide	14
f) Freie Fettsäuren	18
C. Ergebnisse	21
1. Gesamtcholesterin	21
2. Freies Cholesterin	21
3. Triglyceride	22
4. Phosphatide	22
5. Freie Fettsäuren	23
D. Diskussion	29
E. Zusammenfassung	39

A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Der Fettgehalt des Blutes gewann in den letzten Jahren zunehmend an Interesse.

Die primären Fettstoffwechselstörungen zeigen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Blutlipide. Man unterscheidet Lipoidosen mit und ohne Blutfettveränderungen. (22, 23, 6)

Der seltener vorkommenden Gruppe der primären Fettstoffwechselstörungen steht die zahlenmäßig weitaus umfangreichere Gruppe der symptomatischen Fettstoffwechselstörungen gegenüber.

Hier steht die Atherosklerose, für die neben anderen Faktoren erhöhte Blutfette ätiologisch eine Rolle spielen, an wichtiger Stelle.

Auch der Diabetes mellitus geht mit je nach Dauer und Schwere der Erkrankung mehr oder weniger starker Erhöhung der Blutlipide einher.

Bei Lebererkrankungen ist die Erhebung eines Lipidstatus häufig von diagnostischem Interesse.

Die renale Hyperlipämie beim nephrotischen Syndrom ist bekannt.

Auch beim Myxödem werden Blutfettvermehrungen gesehen, bei Hyperthyreosen Blutfettverminderungen.

Dem breiten Indikationsfeld von Blutfettuntersuchungen stehen zahlreiche Methoden zur Bestimmung der einzelnen Blutfettfraktionen gegenüber. Sie sind jedoch trotz der Verbesserungen und Vereinfachungen, die sie in der letzten Zeit erfahren haben, auch heute noch sehr aufwendig. Denn neben den erforderlichen Geräten ist es vor allem die Forderung nach exakte-

ster Arbeitsweise von geschultem Personal, die zur Durchführung der zeitraubenden Einzelbestimmungen eines Lipidstatus unerlässlich ist. Daher müssen Lipiduntersuchungen heute zumeist noch größeren Laboratorien vorbehalten bleiben.

Trotzdem besteht auch für den Praktiker kein Grund, auf notwendige Blutfettuntersuchungen zu verzichten. Vielmehr bietet sich die Möglichkeit an, Blutproben zur Lipiduntersuchung an größere Laboratorien zu verschicken.

Um die Kapazität eines Lipidlabors möglichst groß zu halten, ist es ratsam, wegen der zeitlichen Aufwendigkeit der Methoden eine Anzahl von Blutproben zu sammeln und gemeinsam zu bestimmen. Auf diese Weise können zeitraubende Einzeluntersuchungen umgangen werden.

Voraussetzung für Verschickung und Lagerung von Blutproben ist die genaue Kenntnis der Stabilität der einzelnen Lipidfraktionen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

Auf diesem Gebiet liegen bisher kaum Untersuchungen vor. Es sollte deshalb die Aufgabe dieser Arbeit sein, unter verschiedenen Lagerungszeiten und -temperaturen das Verhalten der einzelnen Fettfraktionen im Plasma festzustellen.

Es wurden folgende Fraktionen bestimmt: Gesamtcholesterin, Freies Cholesterin, Triglyceride, Phosphatide, Freie Fettsäuren.

B. METHODIK

1. Probanden.

Es wurden 30 Blutproben von 30 Personen verschiedenen Alters und Geschlechts untersucht. Es handelte sich bei einem Teil der Probanden um Gesunde, ein Teil hatte aber auch wegen verschiedener Erkrankungen die Medizinische Poliklinik zu Marburg aufgesucht.

2. Blutentnahme.

Die Blutproben wurden aus den leicht gestauten Armvenen entnommen. Das Blut wurde in heparinisierten Röhrchen aufgefangen und sofort 5 Minuten lang bei $4 \cdot 10^3$ U/min zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und auf je 6 mit Gummistopfen verschlossene Glasröhrchen verteilt.

3. Lagerung.

Jede der 30 Proben war in 6 Portionen aufgeteilt worden. Die erste Portion wurde sofort bestimmt. Eine weitere wurde 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Eine dritte stand 3 Tage, eine vierte 7 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank. Die restlichen zwei Proben wurden 4 Wochen lang bei -20°C bzw. bei -60°C eingefroren.

4. Durchgeführte Bestimmungen.

Es wurden jeweils bei den 5 zuerst angeführten Portionen der 30 Proben Gesamtcholesterin, Freies

Cholesterin, Triglyceride, Phosphatide und Freie Fettsäuren bestimmt. Lediglich bei der 4 Wochen bei -60°C eingefrorenen Portion beschränkten wir uns auf die Bestimmung der Freien Fettsäuren. Außerdem schlossen wir eine kinetische Untersuchungsreihe der Freien Fettsäuren an. Hierzu wurden von weiteren 5 Personen Blutproben gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte auf die oben beschriebene Weise. Jede der 5 Proben wurde in 13 Portionen aufgeteilt. Die erste Portion wurde sofort verarbeitet. Die restlichen Portionen wurden bei Zimmertemperatur gelagert und in folgenden Zeitabständen nach der Entnahme verarbeitet: $1/2$ Std, 2 Std, 5 Std, 8 Std, 12 Std und dann alle 12 Stunden bis 96 Std nach der Blutentnahme.

5. Blutprobenverarbeitung.

Die Verarbeitung der Blutproben erfolgte in folgender Reihenfolge: Zunächst bestimmten wir die Freien Fettsäuren. Dann schlossen wir die Extraktion der Triglyceride und Phosphatide an. Anschließend folgten die Bestimmungen der Triglyceride und der Phosphatide. Zuletzt untersuchten wir das Gesamtcholesterin und das Freie Cholesterin.

a) G e s a m t c h o l e s t e r i n

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins bedienten wir uns der Methode von Watson (27) in der Modifikation nach Richterich und Lauber (20), die auf der Farbreaktion von

Liebermann (19) und Burchardt (3) beruht.

Prinzip:

Sterine geben in wasserfreiem Milieu mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure durch die Bildung polymerer Kohlenwasserstoffe eine blaugrüne Färbung, deren Intensität photometrisch gemessen wird.

Durch den Zusatz von methylierten Benzolsulfonsäuren, die das Eiweiß in Lösung halten, wird die sonst übliche Eiweißfällung unnötig.

Chemikalien:

Eisessig p. a.

Cholesterin rein

Essigsäureanhydrid p. a.

konzentrierte Schwefelsäure p. a.

2,5 Dimethyl-Benzolsulfonsäure p. a.

Reagentien:

Cholesterinreagens.

5,5 mg Dimethyl-Benzolsulfonsäure wurden in 100 ml Eisessig gelöst. Dazu werden 300 ml Essigsäureanhydrid und 100 ml Eisessig gegeben. Gut verschlossen ist das Reagens bei Zimmertemperatur mehrere Monate haltbar.

Cholesterinstandard.

Nach mehrfachem Umkristallisieren und Trocknen in der Trockenpistole wurden 400 mg Cholesterin in 100 ml Eisessig gelöst.

Durchführung der Bestimmung:

In trockene Analysenröhrchen werden 0,05 ml Serum bzw. 0,05 ml destilliertes Wasser für den Leerwert und 2,5 ml Cholesterinreagens pipettiert. In die Standardröhrchen werden 0,05 ml Standardlösung und 2,5 ml Cholesterinreagens pipettiert. Zur Abkühlung werden die Röhrchen 10 Minuten stehengelassen. Danach erfolgt die Zugabe von 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure zu jedem Ansatz. Es bilden sich Präzipitate, bis zu deren Auflösung die Röhrchen geschüttelt werden müssen. 10 Minuten nach Zugabe der Schwefelsäure werden bei einer Wellenlänge von 578 nm und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktionen im Eppendorf-Photometer gemessen.

Berechnung:

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt

$$1. \frac{C_p}{C_{St}} = \frac{E_p}{E_{St}}$$

wobei C = Konzentration

E = Extinktion

p = zur Probe gehörig

St = zum Standard gehörig

bedeuten. Ebenso gilt:

$$2. \quad C_p \frac{E_p}{E_{St}} = C_{St}$$

Gleiche Konzentrationen von verestertem Cholesterin gaben in Chloroform gelöst etwas höhere Extinktionen als im Serum. Es ergibt sich daraus ein Korrekturfaktor von $\frac{405}{400}$.

$$3. \frac{\text{mg Cholesterin}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 405$$

Kritik:

Durch die Umgehung der sonst üblichen Extraktion und Enteiweißung zur Bestimmung des Gesamtcholesterins werden durch Reduktion der Arbeitsschritte auch die Fehlerquellen vermindert. Falsche Ergebnisse werden bei Verarbeitung von hämolytischen oder ikterischen Seren erhalten.

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite ergab bei 11 Parallelbestimmungen einen Mittelwert von 288 mg/100 ml mit einer Streuung von $\pm 13,45$ mg/100 ml (24, 17).

b) F r e i e s C h o l e s t e r i n .

Auch für die Bestimmung des freien Cholesterins wandten wir die Methode nach Watson (27) in der Modifikation nach Hoeflmayr und Fried an (15, 16).

Prinzip:

Bei dieser Methode wird das freie Cholesterin zusammen mit dem Eiweiß gefällt. Der Nachweis des freien Cholesterins erfolgt nach der Liebermann-Burchardt'schen Reaktion (3, 19).

Chemikalien:

Eisessig p. a.

Cholesterin rein

Essigsäureanhydrid p. a.

konzentrierte Schwefelsäure p. a.

Digitonin p. a.

Isopropanol p. a.

Reagentien:

Cholesterinreagens siehe 5a)

Digitonin 0,25%ig in Isopropanol.

Digitonin-Cholesterinstandard: 200 mg mehrfach umkristallisiertes und getrocknetes Cholesterin und 888 mg kristallines Digitonin werden in 80 ml Eisessig unter Erwärmen gelöst. Nach längerem Sieden wird die Lösung quantitativ in ein 100 ml Meßkölbchen überführt und bis zur Marke mit Eisessig aufgefüllt.

Durchführung der Bestimmung:

Zum Ansetzen von Analyse und Serumleerwert werden je 0,05 ml Serum in Zentrifugengläser gegeben. In die Analysengläser werden zusätzlich 1,0 ml 0,25%ige Digitonin-Isopropanollösung, in die Serumleerwertgläser 1,0 ml Isopropanol gegeben. Nach 10 min. wird der entstandene Niederschlag scharf abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand weiterverarbeitet.

In weiteren Gläsern wird der Standard angesetzt, hier werden zu 0,05 ml Standardlösung bzw. zu 0,05 ml Digitonin-Isopropanollösung (Standard-leerwert) 2,5 ml Cholesterin-Reagens zugefügt, ebenso erfolgt die Zugabe von 2,5 ml Cholesterin-Reagens bei Analyse und Serumleerwert.

Der nun entstandene Niederschlag wird bei Analyse und Serumleerwert aufgewirbelt mit einem Glasstab und dann abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in frische trockene Reagensgläser überführt und mit 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach 10-15 minütigem Abkühlen werden die Extinktionen der Analysen gegen die der Leerwerte bei einer Wellenlänge von 578 nm und einer Schichtdicke von 1 cm im Jppendorf-Photometer gemessen.

Berechnung:

$$\frac{\text{mg freies Cholesterin}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 200$$

Fehlerbreite:

Schneider (24) und Kaffarnik (17) stellten bei elf Parallelbestimmungen einen Mittelwert von 45 mg/100 ml mit einem Streubereich von $\pm 7,9$ mg/100 ml fest.

Kritik:

Es wird mit dem freien Cholesterin zusammen Eiweiß mitgefällt. Durch den bei jeder Serumprobe mitgeführten Serumleerwert wird eventuell mitgerissenes verestertes Cholesterin als Fehlermöglichkeit ausgeschlossen.

Da die Farbintensität nach 15 Minuten nachläßt, müssen die Extinktionen schnell abgelesen werden.

c) Ex t r a k t i o n d e r L i p i d e

Die Extraktion der Lipide für die Bestimmung von Triglyceriden und Phosphatiden wurde nach der Methode von Folch und Lees (9) durchgeführt.

Chemikalien:

Chloroform DAB 6

Methanol p. a.

Natriumchlorid p. a.

Durchführung der Extraktion:

In Meßkölbchen werden 1 ml Serum und 32 ml Chloroform mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur besseren Trennbarkeit werden 20 ml des Filtrats in Schütteltrichter überführt und mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln und einer anschließenden Wartezeit von 30 Minuten kann die Chloroformphase abgelassen und filtriert werden. Die Weiterverarbeitung des Extrakts ist für die Bestimmung der Triglyceride und Phosphatide verschieden.

d) T r i g l y c e r i d e

Die Triglyceridbestimmung wird nach der Methode von van Handel und Zilversmit (13) mit Hilfe der Reaktion von Lambert und Neish (18) durchgeführt.

Prinzip:

Das im Chloroformextrakt befindliche Glycerin ist Bestandteil von Phosphatiden, Mono-, Di- und Triglyceriden. Die Phosphatide werden durch Adsorption an aktiviertes Kieselgel abgetrennt. Die Glyceride werden vollständig verseift, das Glycerin oxydiert und der in äquimolarer Menge entstehende Formaldehyd mit Chromotropsäure zur Bildung eines photometrisch meßbaren Farbkomplexes gebracht.

Chemikalien:

konzentrierte Schwefelsäure p. a.

Äthanol p. a.

Natriumperjodat p. a.

Kaliumhydroxid p. a.

Natriumhydroxid p. a.

Arsentrioxid p. a.

Chromotrop - Natriumsalz p. a.

Tristearin p. a.

Kieselgel 0,08 mm

Reagentien:

0,4 %ige alkoholische Kalilauge (2%ige KOH wird vor Gebrauch mit Äthanol 1:5 verdünnt).

0,2 n Schwefelsäure (3ml konzentrierte Schwefelsäure wurden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt).

0,05 mol Natriumperjodat (1,07 gr. ad 100 ml destilliertes Wasser).

0,5 mol Natriumarsenat (2,25 gr. NaOH + 5 gr. As_2O_3 ad 100 ml destilliertes Wasser).
0,2 %ige Chromotropsäure (2.24 gr. Chromotrop-Natriumsalz ad 200 ml aqua bidest. = Lösung A.
600 ml konzentrierte Schwefelsäure werden vorsichtig unter Kühlung zu 300 ml destilliertem Wasser gegeben = Lösung B. Nach dem Erkalten werden Lösung A und Lösung B zusammengegeben. Die Chromotropsäure muß in dunkler Flasche im Kühlschrank aufbewahrt werden und ist so 2 - 3 Wochen haltbar.

Triglyceridstandard: 0,5 gr. Tristearin werden in Chloroform p. a. gelöst und ad 100 ml aufgefüllt. Die Eichlösung enthält 5000 μg Glyceride pro ml.

Durchführung der Bestimmung:

1 ml des Triglyceridstandards wird wie die oben beschriebene Extraktion des Plasmas extrahiert.

Etwa 10 ml des Chloroformextraktes von Plasma und Standard werden mit je 1 g aktiviertem Kieselgel (1 Stunde bei 100°C im Trockenschrank) versetzt, kräftig geschüttelt und filtriert.

Je 0,5 ml des Filtrats werden in 3 Reagensgläser mit Schliffstopfenverschluß pipettiert und in einem leicht kochenden Wasserbad eingedampft. Ebenso wird mit je 0,5 ml Standardfiltrat verfahren. Nach Abkühlung werden in je zwei der Röhrchen je 0,5 ml 0,4 %ige alkoholische Kalilauge (verseifte Probe = späterer Messwert) gegeben, das dritte Röhrchen wird

mit 0,5 ml Äthanol versetzt (unverseifte Probe = späterer Leerwert).

Nach Durchschütteln wird in einem Wasserbad von 60 - 70°C eine 15minütige Verseifung durchgeführt, hierzu werden Glasstopfen lose auf die Röhrchen aufgesetzt. Nach Abkühlung werden zu allen Proben je 0,5 ml 0,2 n Schwefelsäure gegeben. Dann wird der Alkohol im kochenden Wasserbad vollständig verdampft. Sobald der Alkoholgeruch im Dampf verschwunden ist, werden die Proben wieder abgekühlt und zur Oxydation des Glycerins mit je 0,1 ml 0,05 mol Natriumperjodatlösung versetzt und durchgeschüttelt. Die Proben werden 15 Minuten stehengelassen, dann wird die Oxydation durch Zugabe von 0,1 ml 0,5 mol Natriumarsenat beendet. Nach weiteren 10 Minuten werden in jedes Glas unter Lichtabschluß 5 ml 0,2 %ige Chromotropsäure gegeben, geschüttelt und dann im Dunkeln bei 100 °C erhitzt (Trockenschrank). Die photometrische Messung der abgekühlten Proben erfolgt gegen den Leerwert im Eppendorf - Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Berechnung:

$$\begin{aligned} \frac{\text{mg Triglyceride}}{100 \text{ ml}} &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 5000 \cdot 0,1 \\ &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 500 \end{aligned}$$

Kritik:

Die Reaktion ist nicht für Formaldehyd spezifisch. Bei vollständiger Abdampfung des Alkohols sind jedoch keine ins Gewicht fallenden Störmöglichkeiten gegeben, da im Glycerid-Extrakt keine anderen mit Perjodat reagierenden Verbindungen vorkommen. Bei unvollständigem Abdampfen von Alkohol werden die Proben beim Erhitzen mit Chromotropsäure trübe.

Das Verdampfen von Glyceriden wird verhindert durch die Zugabe von Wasser (bzw. 0,2 n Schwefelsäure).

Neben den Triglyceriden werden die in geringer Menge vorkommenden Diglyceride miterfaßt. Da die Monoglyceride in der unverseiften Leerwertprobe ebenfalls Formaldehyd abgeben, kommt es zu einer entsprechenden Farbbildung im Leerwert, die eine Miterfassung der Monoglyceride verhindert.

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei elf Paralellbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 185 mg / 100 ml einen Streubereich von $\pm 7,05$ mg/100 ml.
(17, 24)

e) P h o s p h a t i d e

Die Bestimmung der Phosphatide erfolgte nach der Methode von Bartlett (2), mit der Voraschung nach Allen (1).

Prinzip:

Im Folch - Extrakt wurde der Lipidphosphor bestimmt und die Phosphatide berechnet.

Chemikalien:

70%ige Perchlorsäure p. a.

Ammoniummolybdat p. a.

Natriumsulfit p. a.

1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure p. a.

Natriumpyrosulfit p. a.

Kaliumdihydrogenphosphat p. a.

konzentrierte Schwefelsäure p. a.

Reagentien:

Reduktionsreagens nach Fiske und Subba Row: (8).

Zu 200 ml frisch hergestellter 13,7 %iger

Natriumpyrosulfitlösung werden unter Umrühren

0,5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure und 2g

wasserfreies Natriumsulfit gegeben. Die Lösung

wird filtriert und in dunkler Flasche aufbewahrt.

Sie muß alle 2 -3 Wochen frisch angesetzt werden.

Ammoniummolybdat 0,22%ig (1,1 g ad 500 ml destilliertes Wasser).

Anorganischer Phosphorstandard:

0,3509 g des Kaliumdihydrogenphosphat wird nach

Trocknung in der Nacht mit Phosphorpentoxyd bei

60° in der Trockenpistole in einem 1000 ml Meß-

kolben in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach

Zusatz von 10 ml 10 n Schwefelsäure wird mit bi-

destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die so hergestellte Stammlösung enthält in 5 ml 0,4 mg Phosphor. Sie ist unbegrenzt haltbar.

Durchführung der Bestimmung:

Die Analyse wird als Doppelbestimmung durchgeführt.

0,5 ml des bei der Triglyceridbestimmung abgezweigten Plasmaextraktes werden eingedampft, mit 0,4 ml 70%iger Perchlorsäure versetzt und 60 Minuten bei 180 °C verascht. Nach dem Erkalten erfolgt die Zugabe von 4,6 ml 0,22%iger Ammoniummolybdatlösung und 0,4 ml Reduktionsreagens. Nach gutem Schütteln werden die Röhrchen in ein leicht siedendes Wasserbad gestellt und nach 7 Minuten rasch abgekühlt.

Es werden Leerwerte mitgeführt, indem in leere Gläser 0,4 ml 70%ige Perchlorsäure gegeben wird und dann parallel zu den Analysenproben weiterverfahren wird.

Gesondert werden Standardproben mitgeführt.

Hierzu wird am Tag der Bestimmung 2,5 ml der Standardlösung mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml verdünnt. In zwei Reagenzgläser werden je 0,5 ml Tagesphosphorlösung pipettiert, eingedampft und mit den übrigen Proben weiterverarbeitet.

Das Ablesen der Extinktionen erfolgt gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge von 830 nm und einer Schichtdicke von 1 cm im Spektralphotometer nach Zeiss.

Berechnung:

Wegen der Verdünnung der Serumproben bei der Extraktion gegenüber dem nicht extrahierten Standard gilt:

$$\text{Phosphor / ml Serum} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32$$

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1$$

Der Gehalt an Phosphatiden als Lecithin errechnet sich aus dem Phosphorgehalt multipliziert mit 25:

$$\frac{\text{mg Phosphatide (als Lecithin)}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 25 \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1$$

$$= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 320$$

Kritik:

Durch die siebenminütige Erhitzung bei der Farbbildung wird diese intensiver und es entsteht ein steiles Absorptionsmaximum bei 830 nm. Durch die hohe Empfindlichkeit der Reaktion ist diese anfällig gegen Verunreinigungen, insbesondere gegen Reste von Spülmitteln oder schlechtes destilliertes Wasser.

Fehlerbreite:

Bei 11 Parallelbestimmungen ergab sich bei einem

Mittelwert von 229 mg/100 ml eine Standardabweichung von $\pm$ 4,09 mg/100 ml. (17, 24)

f) Freie Fettsäuren

Zur Bestimmung der Freien Fettsäuren fand in leicht modifizierter Form die Methode nach Duncombe (5) Anwendung.

Prinzip:

Die Freien Fettsäuren werden mit Chloroform als Kupfersalz extrahiert, anschließend wird das Kupfer mit Diäthylthiocarbamat kolorimetrisch nachgewiesen.

Chemikalien:

Chloroform p. a.

Kupfer (II)nitrat p. a.

Diäthylthiocarbamat p. a.

Triäthanolaminhydrochlorid p. a.

Natriumhydroxid p. a.

Palmitinsäure p. a.

sekundäres Butanol p. a.

Reagentien:

Kupferreagens: 6,45 %ige Kupfer(II)nitratlösung wird mit 1 molarer Triäthanolaminhydrochloridlösung (18,57 g / 100 ml bidestilliertes Wasser) am Tag der Bestimmung gemischt und mit gesättigter Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt.

Diäthylthiocarbamat 0,25 %ig in sekundärem Butanol.

Palmitinsäurestandard: 0,1 mM:

12,85 mg Palmitinsäure p. a. werden in Chloroform gelöst und auf 500 ml aufgefüllt.

Vor dem Versuch wird die Stammlösung 1:4 verdünnt.

Durch diese Verdünnung wird eine Ablesung im optimalen Skalenbereich ermöglicht.

Die Extinktion des Standards muß mit 4 multipliziert werden.

Durchführung der Bestimmung:

Die Untersuchung wird als Dreifachbestimmung durchgeführt. In Schliffstopfenverschlußgläser werden 5 ml Chloroform bzw. 5 ml Palmitinsäurestandard, 2,5 ml Kupferreagens und 0,5 ml Plasma bzw. als Leerwert Aqua bidestillata pipettiert. Nach sorgfältigem Verschuß mit Glasstopfen werden die Gläser in einem Schüttelapparat mit einer Frequenz von 120 U/min 15 Minuten lang waagerecht geschüttelt. Anschließend wird der Inhalt der Gläser in Zentrifugengläser überführt und 15 Minuten bei $4 \cdot 10^3$ U/min zentrifugiert. Dann wird die wässrige Kupfersalzphase mit einer PVC - Kanüle abgesaugt und die als Trennmembran entstandene Proteinschicht im Ganzen mit einer weitlumigeren Glaspipette entfernt. Anschließend werden 3 ml der Chloroformphase abpipettiert, ohne die Glaswand der Zentrifugenröhrchen mit der Pipette zu berühren. Hierzu werden 0,5 ml Diäthyl-dithiocarbamat gegeben, geschüttelt und im Eppendorf - Photometer bei 440 nm und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktionen gegen den Leerwert gemessen.

Berechnung:

$$\frac{\text{mval FFS}}{l} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 0,1 \cdot 10$$

$$= \frac{E_P}{E_{St}}$$

Kritik:

Der Aufwand dieser Methode ist gegenüber den Titrationsmethoden geringer, da sie nicht in CO₂-freier Atmosphäre durchgeführt werden muß. Es entfällt ferner der subjektive Faktor beim Ablesen des Farbumschlags. Hämolytisches oder ikterisches Plasma beeinträchtigt die Genauigkeit.

Fehlerbreite:

Zur Bestimmung der Fehlerbreite führten Schneider und Kaffarnik 11 Parallelbestimmungen im gleichen Plasma durch. Sie fanden einen Mittelwert von 0,424 mval/l und einen Streubereich von $\pm 0,016$ mval/l. (17, 24)

C. ERGEBNISSE

1. Gesamtcholesterin

Die Mittelwerte des Gesamtcholesterins in mg/100 ml sind für die Sofortbestimmung sowie für die Bestimmungen nach 3-tägigem Stehen im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur und 7-tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank und 4-wöchigem Einfrieren bei -20°C in Tabelle I zusammengefaßt.

Es zeigt sich im Vergleich zum Ausgangsmittelwert von 286 mg/100 ml nach 3-tägigem Stehen im Kühlschrank ein Mittelwert von 281 mg/100 ml, nach 3 Tagen bei Zimmertemperatur 280 mg/100 ml, nach 7 Tagen im Kühlschrank 292 mg/100 ml und nach 4 Wochen bei -20°C 266 mg/100 ml.

Im t - Test nach STUDENT haben sich diese geringen Abweichungen nicht als signifikant erwiesen. (Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$.)

Siehe Tabelle I.

2. Freies Cholesterin

Die Mittelwerte für das Freie Cholesterin in mg / 100 ml sowie ihre Streuungen sind in Tabelle II unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen zusammengestellt.

Der Mittelwert der Sofortbestimmung beträgt 67 mg / 100 ml. Die weiteren Mittelwerte betragen für 3 Tage Kühlschrank 70 mg/100 ml,

für 3 Tage Zimmertemperatur 61 mg/100 ml,
für 7 Tage Kühlschrank 66 mg/100 ml und
für 4 Wochen bei -20°C 72 mg/100 ml.

Auch für das Freie Cholesterin ergab sich
im t - Test nach STUDENT keine signifikante
Abweichung der gelagerten Proben im Ver-
gleich zu den sofort bestimmten Proben.

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$.)

Siehe Tabelle II.

3. Triglyceride

Die Mittelwerte der Triglyceride in mg/100 ml
und ihre Streuungen unter den verschiedenen
Lagerungsbedingungen zeigt die Tabelle III.

Bei der Sofortbestimmung lag der Mittel-
wert bei 178 mg/100 ml. Nach 3 Tagen Kühl-
schrank wurden 193 mg/100 ml, nach 3 Tagen
Zimmertemperatur 175 mg/100 ml gemessen.

Der Mittelwert nach 1 Woche Kühlschrank be-
trug 193 mg/100 ml, nach 4 Wochen bei -20°C
170 mg/100 ml. Auch die Triglyceride ließen
im t-Test nach STUDENT keine Signifikanz er-
kennen.

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$).

Siehe Tabelle III.

4. Phosphatide

Eine Übersicht über die Mittelwerte der
Phosphatide unter den verschiedenen Bedingun-
gen der Aufbewahrung zeigt die Tabelle IV.

Bei Sofortbestimmung lag der Mittelwert bei 233 mg/100 ml. Nach 3 Tagen im Kühlschrank betrug der Mittelwert 247 mg/100 ml, nach 3 Tagen bei Zimmertemperatur 236 mg/100 ml, nach 7 Tagen im Kühlschrank 249 mg/ 100 ml. und nach 4 Wochen Einfrieren bei -20°C 237 mg/100 ml.

Die Mittelwerte unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen zeigten im Vergleich zum Ausgangswert ebenfalls keine signifikanten Abweichungen, wie der Ausfall des t - Testes nach STUDENT ergab.

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$).

Siehe Tabelle IV

5. F r e i e F e t t s ä u r e n

Die Mittelwerte für die Freien Fettsäuren in mVal/l gelten für die Sofortbestimmung, nach 3 - tägigem Stehen im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur, nach 7 - tägigem Stehen im Kühlschrank sowie nach 4 - wöchigem Einfrieren bei -20°C und bei -60°C . Sie sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Es zeigten sich bei einem Ausgangswert von 0,288 mVal/l eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes des 3 Tage bei Zimmertemperatur gelagerten Plasmas auf 0,827 mVal/l, sowie eine signifikante Erhöhung des 7 Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrten Plasmas auf 0,400 mVal/l.

Tabelle I

	Sofort	3 Tg. Kühl- schrank	3 Tg. Zimmer- temperatur	7 Tg. Kühl- schrank	4 Wochen -20°C
Mittelwert Ges. Chol. in mg/100 ml	286	281	280	293	267
Streuung des Mittelwertes	+96	+86	+80	+94	+88
t.	0,205	0,260	0,284	0,832	
α	83,895	79,695	77,801	41,161	
Signifikanz	-	-	-	-	-

Tabelle I zeigt die Mittelwerte des Gesamtcholesterins in mg/100 ml unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Streuung des Mittelwertes sowie die Signifikanzberechnung nach STUDENT. (Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$). (n = 30).

Tabelle II

	Sofort	3 Tg. Kühl- schrank	3 Tg. Zimmer- temperatur	7 Tg. Kühl- schrank	4 Wochen - 20°C
Mittelwert Nr. Chol. in mg/100 ml	67	70	61	66	72
Streuung des Mittelwertes	+16	+22	+18	+18	+16
t		0,678	1,300	0,252	1,143
α		50,302	20,309	80,301	26,193
Signifikanz	-	-	-	-	-

Tabelle II zeigt die Mittelwerte des freien Cholesterins in mg/100 ml unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Streuung des Mittelwertes sowie die Signifikanzberechnung nach STUDELT. (Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$) (n = 30)

Tabelle III

	Sofort	3 Tg. Kühl- schrank	3 Tg. Zimmer- temperatur	7 Tg. Kühl- schrank	4 Wochen -20°C
Mittelwert TG in mg/100 ml	178	193	175	193	170
Streuung des Mittelwertes	± 115	± 141	± 128	± 129	± 98
t		0,465	0,114	0,461	0,322
α		64,486	90,985	64,792	74,984
Signifikanz	-	-	-	-	-

Tabelle III zeigt die Mittelwerte der Triglyceride in mg/100 ml unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Streuung des Mittelwertes sowie die Signifikanzberechnung nach STUDENT. (Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$). (n = 30)

Tabelle IV

	Sofort	3 Tg. Kühl- schrank	3 Tg. Zimmer- temperatur	7 Tg. Kühl- schrank	4 Wochen -2000
Mittelwert PL in mg/100 ml	233	247	236	249	237
Streuung des Mittelwertes	+52	+70	+74	+65	+63
t		0,883	0,167	1,099	0,277
α		38,405	86,839	28,022	78,336
Signifikanz	-	-	-	-	-

Tabelle IV zeigt die Mittelwerte der Phosphatide in mg/100 ml unter den verschie-
denen Lagerungsbedingungen, die Streuung des Mittelwertes sowie die Signifikanz-
berechnung nach STUDENT. (Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$) (n = 30)

Tabelle V

- 28 -

	Sofort	3 Tg. Kühl- schrank	3 Tg. Zimmer- temperatur	7 Tg. Kühl- schrank	4 Wochen -20°C	4 Wochen -60°C
Mittelwert FFS in mVal/l	0,288	0,323	0,827	0,400	0,299	0,249
Streuung des Mittelwertes	+0,142	+0,146	+0,324	+0,128	+0,142	+0,130
t		0,975	8,442	3,364	0,310	1,176
α		33,708	0,000	0,201	75,835	24,825
Signifikanz	-	-	+	+	-	-

Tabelle V zeigt die Mittelwerte der Freien Fettsäuren in mVal/l unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Streuung des Mittelwertes sowie die Signifikanzberechnung nach STUDENT. (Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$) (n = 30)

Die 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrten Proben ergaben mit 0,323 mVal/l, die bei -20°C eingefrorenen Proben mit 0,299 mVal/l und die bei -60°C eingefrorenen Proben mit 0,249 mVal/l keine signifikanten Abweichungen der Mittelwerte.

Die statistische Berechnung erfolgte wieder nach dem t - Test nach STUDENT.

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$.)

Siehe Tabelle V.

D. DISKUSSION

In der Literatur sind uns nur wenige Untersuchungen über die Stabilität der Blutlipide unter verschiedenen Lagerungsbedingungen bekannt.

L. Walford, M. Sowa und D. Daley (26) wiesen nach, daß in Plasmaproben, die ein halbes Jahr bei einer Temperatur von -10°C aufbewahrt wurden, keine Veränderung des Cholesteringehaltes eintrat.

A. Wagner, M. Birkemeyer und J. Weinstock (25) inkubierten Serum bei 37°C und stellten bei 14 Probanden nach 72 Stunden einen durchschnittlichen Abfall des freien Cholesterins von 41 mg auf 15 mg fest.

J. Hoeflmayr (14) registrierte bei 10 unsteril bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Seren nach 2 Tagen einen Abfall des Gesamtcholesterins um ca. 15% des Ausgangswertes, ferner stellte er bei 10 unsteril bei $+20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Proben nach 5 Tagen einen Abfall um 5 % des Ausgangswertes fest. Dagegen wies er bei 10 unsteril bei $+37^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Proben nach 4 Tagen einen Anstieg um 30% des Ausgangswertes nach.

H. von Elmendorff und D. Valleé (7) untersuchten den Abbau von Plasmalipiden in Blutkonserven und beobachteten eine ständige Zunahme der freien Fettsäuren bei Lagerung im Eisschrank bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$. Während im frischen Plasma ein Gehalt von 4-7 mg% gemessen wurde, ließ sich nach 3-4wöchiger Lagerung im Eisschrank ein Anstieg auf 80 mg% messen.

V. P. Dole (4) inkubierte Plasma bei 37°C vor der Extraktion der freien Fettsäuren. Er konnte einen stündlichen Anstieg von etwa 35 μEq registrieren. Die Zunahme der freien Fettsäuren wird auf die Hydrolyse veresterter Fettsäuren zurückgeführt.

R. S. Gordon jr. und A. Cherkes (11) wiesen nach, daß kalt aufbewahrtes Plasma innerhalb von 4 Stunden keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an freien Fettsäuren aufweist.

R. S. Gordon jr. (10) stellte fest, daß bei -20°C eingefrorenes Plasma selbst nach 5 Tagen keine Erhöhung der Freien Fettsäuren zeigt.

Dagegen erhielt er bei flüssigem Plasma, das 5 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurde und der Luft ausgesetzt war, keine zuverlässigen Ergebnisse mehr.

W. Weigel, A. Krautwald und H. Linke (28) stellten ebenfalls vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an freien Fettsäuren in bei Zimmertemperatur und bei unter 0°C eingefrorenem Plasma an. Auch sie fanden bei den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben einen umso stärkeren Anstieg der freien Fettsäuren, je länger die Aufbewahrungszeit dauerte. Dagegen stellten sie keine Veränderung in den bei unter 0°C eingefrorenen Proben fest.

C. Munkner (20) lagerte Plasmaproben über 24 Stunden bei Zimmertemperatur und beobachtete einen Anstieg der Freien Fettsäuren um 40 %.

M. I. Grossman, L. Palm, G. H. Becker und H. C. Moeller (12) untersuchten Plasmaproben von Ratten nach 4 Stunden Zimmertemperatur, nach 4 Stunden Aufbewahrung bei $+5^{\circ}\text{C}$ und nach 24 Stunden bei $+5^{\circ}\text{C}$. Sie fanden keine Änderung der freien Fettsäuren bei den 4 Stunden bei 5°C aufbewahrten Proben, dagegen hohe Anstiege bei den 24 Stunden bei $+5^{\circ}\text{C}$ und den 4 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben.

Über entsprechende Untersuchungen der Triglyceride und Phosphatide unter verschiedenen Lagerungsbedingungen haben wir in der Literatur vergeblich gesucht.

Unsere Untersuchungen, bei denen Plasma von 30 Probanden verarbeitet wurde, zeigte für die Fraktionen Gesamtcholesterin, freies Cholesterin, Triglyceride und Phosphatide bei Lagerung über 3 und 7 Tage im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$, über 3 Tage bei Zimmertemperatur und über 4 Wochen bei -20°C keine signifikanten Änderungen. Lediglich die Fraktion der freien Fettsäuren zeigt bei 7-tägiger Lagerung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ und bei 3-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur signifikante Anstiege, und zwar um 39 % des Ausgangswertes bei den im Kühlschrank gelagerten Proben und um 187 % des Ausgangswertes bei den bei Zimmertemperatur gelagerten Proben. Dagegen treten keine signifikanten Änderungen bei 3-tägiger Aufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$ sowie bei 4-wöchiger Aufbewahrung bei -20°C beziehungsweise -60°C auf.

Unsere Ergebnisse über die Stabilität des Gesamtcholesterins zeigen unter ähnlichen Lagerungsbedingungen, wie sie Hoefflmayr (14) anwandte, nicht den von ihm beobachteten Abfall des Gesamtcholesterins um ca. 15 % bei

+4°C und um ca. 5% bei 20°C, die Werte bleiben vielmehr konstant. Möglicherweise wird diese leichte Diskrepanz durch unsere größere Probandenzahl erklärt.

In übereinstimmung mit L. Walford et al. (26) konnten wir feststellen, daß in eingefrorenen Plasmaproben innerhalb von 4 Wochen keine Veränderung des Gesamtcholesteringehaltes eintritt.

Während A. Wagner et al. (25) bei Seren, die 3 Tg. bei 37°C inkubiert waren, einen Abfall des freien Cholesterins feststellte, konnten wir nachweisen, daß ein solcher Abfall schon bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur nicht mehr auftritt.

Unsere Untersuchungen über Veränderungen im Gehalt von Plasma an freien Fettsäuren stimmen überein mit den bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen.

H. von Elmendorff und D. Vallée (7) fanden bei 3-4wöchiger Lagerung von Plasma bei +4°C einen erheblichen Anstieg der freien Fettsäuren. Wir konnten bei unserer Versuchsanordnung feststellen, daß dieser Anstieg signifikant erst in der Spanne zwischen 3. und 7. Tag einsetzt. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der Beobachtung von R. S. Gordon jr. (10),

der nach 5-tägiger Lagerung von Plasmaproben keine zuverlässigen Meßergebnisse der freien Fettsäuren mehr erhielt.

Gordons Untersuchungen über 5 Tage bei -20°C eingefrorene Plasmaproben dehnten wir auf 4 Wochen unter gleichen Bedingungen aus mit dem Ergebnis, daß auch in dieser Zeit keine Änderung im Gehalt an freien Fettsäuren auftritt.

Auch wir fanden, wie vor uns W. Weigel et al. (28) und C. Munkner (20) bei den bei Zimmertemperatur gelagerten Plasmaproben hoch signifikante Anstiege in der Fraktion der freien Fettsäuren, die uns zu einer weiteren Untersuchungsreihe veranlaßten.

Hierzu wurden Plasmaproben von 5 weiteren Probanden in je 13 Portionen aufgeteilt, von denen die erste sofort, die zweite nach $1/2$ Stunde, die dritte nach 2 Stunden, die vierte nach 5 Stunden, die fünfte nach 8 Stunden, die sechste nach 16 Stunden, die siebente nach 24 Stunden und die achte bis dreizehnte in 12-stündigen Abständen nach Lagerung bei Zimmertemperatur bestimmt wurden.

Es zeigte sich bei einem Ausgangsmittelwert von $0,277 \text{ mVal/l}$ ein kontinuierlicher Anstieg bis auf maximal $0,972 \text{ mVal/l}$ nach 84 Stunden.

Dieser Anstieg war nach dem FRIEDMAN - Test hoch signifikant. Die Mittelwerte der Freien Fettsäuren nach den verschiedenen Lagerungszeiten bei Zimmertemperatur gehen aus Tabelle VI hervor.

Mit dem t - Test für abhängige Stichproben wurde das Verhalten von je zwei aufeinander folgenden Werten berechnet. Hierbei zeigten sich signifikante Erhöhungen bereits zwischen der 2. und 5. Stunde.

Nicht mehr signifikant waren die Änderungen von der 60. zur 72., der 72. zur 84. und der 84. zur 96. Stunde, also nach 2 1/2 Tagen.

Tabelle VI

	Mittelwerte der FFS in mVal/l	Streuungen der Mittel- werte	
Sofort	0,277	0,1583	
1/2 Stunde	0,287	0,1560	
2	0,321	0,1538	
5	0,366	0,1773	FRIEDMAN - Test
8	0,421	0,2174	
16	0,516	0,2028	$\chi^2 = 56,85$
24	0,537	0,1871	
32	0,703	0,2099	$\alpha = 0,000$
48	0,833	0,2538	
60	0,931	0,2924	Signifikanz, wenn
72	0,958	0,1538	$\alpha \leq 5$
84	0,972	0,1645	
96	0,957	0,2191	

Tabelle VI zeigt die Mittelwerte der Freien Fettsäuren und die Streuung der Mittelwerte sowie die Signifikanzberechnung nach dem FRIEDMAN - Test für die verschiedenen Lagerungszeiten bei Zimmertemperatur.

(Signifikanz, wenn $\alpha \leq 5$) (n = 5).

Aus unseren Untersuchungen ergeben sich Richtlinien zur Verschickung und Lagerung von Plasmaproben, bei denen Lipiduntersuchungen durchgeführt werden sollen.

Werden nur die Bestimmungen von Gesamtcholesterin, freiem Cholesterin, Triglyceriden und Phosphatiden gewünscht, so spielt es keine Rolle, ob die Plasmaproben sofort nach der Entnahme oder erst einige Tage nach Lagerung im Kühlschrank verschickt werden. Dies ist deswegen vorteilhaft, weil so mehrere Proben gesammelt und dann gemeinsam an ein zentrales Labor verschickt werden können. Während des Transportes ist es nicht notwendig, die Proben zu kühlen, da bei Zimmertemperatur keine Änderung im Gehalt der genannten Lipidfraktionen eintritt.

Wird außer den oben genannten Lipidfraktionen auch die Bestimmung der freien Fettsäuren gewünscht, so ist es bei sofortiger Verschickung nach der Entnahme ausreichend, die Proben gekühlt bei $+4^{\circ}\text{C}$ zu transportieren. Sollen bis zum Versand einige Proben gesammelt werden, so empfiehlt es sich, bis zum vorgesehenen Termin die Proben einzufrieren.

Wegen der Aufwendigkeit der Erhebung von Lipidstaten ist es rationell, nicht zeitraubende Einzeluntersuchungen durchzuführen, sondern eine

Anzahl von Blutproben bis zur gemeinsamen Bestimmung zu sammeln. Bei der Lagerung der Proben muß gewährleistet sein, daß Lagerungszeiten und -temperaturen eingehalten werden, die die Stabilität der Lipidfraktionen garantieren.

Für die Fraktionen Gesamtcholesterin, freies Cholesterin, Triglyceride und Phosphatide ist eine Aufbewahrung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis zu einer Woche mit keiner Änderung ihrer Konzentration im Plasma verbunden. Ist eine längere Lagerung geplant, so ist es ratsam, die Proben einzufrieren.

Sollen die freien Fettsäuren untersucht werden, so ist eine Lagerung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis zu 3 Tagen nach der Entnahme ausreichend. Längere Aufbewahrung im Kühlschrank führt zu erhöhten Meßergebnissen. Sollte eine längere Lagerung notwendig sein, ist es angezeigt, die Proben einzufrieren.

Für wissenschaftliche Zwecke empfiehlt es sich, zur Ausschaltung geringster Ungenauigkeiten entweder die Bestimmung der freien Fettsäuren direkt nach der Blutentnahme durchzuführen - ein signifikanter Anstieg setzt bei Zimmertemperatur 2 Stunden nach der Blutentnahme ein - oder das Plasma bis zur Bestimmung einzufrieren.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Im Plasma von 30 Probanden wurden die Veränderungen der Blutfette unter 3- bzw. 7-tägiger Lagerung im Kühlschrank, unter 3-tägiger Lagerung bei Zimmertemperatur und unter Aufbewahrung im Eisschrank bei -20 bzw. -60°C untersucht.

Es zeigten sich bei den Fraktionen Gesamtcholesterin, freies Cholesterin, Triglyceride und Phosphatide keine signifikanten Änderungen. Dagegen stiegen die freien Fettsäuren bei 7-tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ um 39 % des Ausgangswertes und bei 3-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur um 187 % des Ausgangswertes an.

Es werden die Ergebnisse mit den bisher in der Literatur angegebenen verglichen und Folgerungen für die Verschickung und Lagerung von Plasmaproben mit dem Ziel der Blutfettbestimmung gezogen.

Literaturverzeichnis

- 1 ALLEN, R. J. L. The estimation of phosphorus.
Biochem. J. 34, 858 (1940)
- 2 BARTLETT, G. R. Phosphorus essay in column
chromatography.
J. biol. Chem. 234, 466 (1959)
- 3 BURCHARDT, H. Beiträge zur Kenntnis des Cho-
lesterins.
Inaug. Diss. Rostock (1889)
- 4 DOLE, V. P. A relation between nonesteri-
fied fatty acids in plasma and
the metabolism of glucose.
J.clin.Invest. 35, 150 (1956)
- 5 DUNCOMBE, W. G. The colorimetric microdeter-
mination of nonesterified fatty
acids in plasma.
Clin.Chim.Acta 9, 122 (1964)
- 6 EGGSTEIN, M. Chemie, Physiologie und Patho-
logie der Plasmaneutralfette.
Habilitationsschrift, Marburg
(1961)
- 7 ELMENDORFF, von H. und Über den Abbau der Plasmalipide
D. VALÉE in Blutkonserven.
Blut 10, 61 (1964)
- FISKE, C.M. and The colorimetric determination
Y. SUBBAROW of phosphorus.
J. biol. Chem. 66, 375 (1925)
- 9 FOLCH, J., M. LEES and A simple method for the iso-
D. H. SLOANE - STANLEY lation and purification of total
lipids from animal tissue.
J. biol. Chem. 226, 497 (1957)
- 10 GORDON, R.S. jr. Unesterified fatty acid in
human plasma: II. The trans-
port function of unesterified
fatty acid.
J.clin. Invest. 36, 810 (1957)
- 11 GORDON, R.S. jr. and Unesterified fatty acids in
A. CHERKES human plasma.
J. clin. Invest. 35, 206 (1956)
- 12 GROSSMAN, M.I., L. PALM, Effect of lipemia and heparin
G.H.BECKER and H.C.MOELLER on free fatty acid content of
rat plasma.
Exp.Biol.Proceed. 87, 312 (1954)
- 13 HANDEL, van E. and Micromethod for the direct
D. E. ZILVERSMIT determination of serum glyceri-
des.
J. Lab. clin.med. 50, 152 (1957)

- 5 WAGNER, A., M. BIRKEMEYER
and J. WEINSTOCK
The influence of in vitro phosphatide upon the disappearance of free cholesterol in heparinized and unheparinized serum upon incubation.
Circulation Res. 3, 165 (1955)
- 6 WALFORD, L., M. SOWA and
D. DALEY
Stability of protein, encymen and non protein constituents of stored frozen plasma.
Amer. J. Clin.Path. 26, 376 (1956)
- 7 WATSON, D.
A simple method for the determination of serum cholesterol.
Clin. Chim. Acta 5, 637 (1960)
- 8 WEIGEL, W., A. KRAUTWALD
und H. LINKE
Ungesättigte, unveresterte Fettsäuren im menschlichen Blutserum. III.
Acta biol. med. german. 2, 341 (1959)

Herrn Prof. Dr. G. W. Löhr gilt mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.

Herrn Dr. H. Kaffarnik bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise und Anregungen verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Diplom-Mathematiker P. Zöfel vom Rechenzentrum der Universität Marburg für die statistische Bearbeitung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 10. 6. 1940 wurde ich in Günzburg geboren. Mein Vater, Rudolf Kempin, war damals Beamter und wurde 1942 nach Leipzig versetzt. Deshalb verzogen wir nach Leipzig, mußten jedoch 1945 von dort flüchten. Wir fanden Unterkunft bei meinen Großeltern in Wiesbaden.

Im Herbst 1946 kam ich dort in die Grundschule, anschließend besuchte ich in Wiesbaden die Helene-Lange-Schule, ein Realgymnasium für Mädchen.

Nach bestandenem Abitur im Frühjahr 1960 begann ich in Mainz mit dem Medizinstudium. 1962 nach bestandenenem Physikum studierte ich 2 Semester an der Universität Göttingen, anschließend setzte ich mein Studium in Marburg fort. Hier lernte ich meinen Mann kennen. Wir heirateten im April 1965. Im Herbst 1966 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen.

Seit 1967 arbeitete ich als Medizinalassistentin in der Universitäts-Hautklinik, Medizinischen Poliklinik, Chirurgischen Klinik und Frauenklinik; Ende April 1969 ist meine Medizinalassistentenzeit abgelaufen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Mainz:

Bäßler, Berg, Dabelow, Ehrenbrand, Höhn, Just,
Kern, Klages, Lang, Laven, Mislin, Schriever,
Straßmann, Watzka, Wellek.

in Göttingen:

Brandis, Bushe, Doering, Frischkorn, Hellner, Hort,
Kirchhoff, Koncz, Kräubig, Lendle, Linzbach, Schoen,
Schwab, Schweer, Spiess, Südhof, Vogt, Witt.

in Marburg:

Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz,
Dölle, du Mesnil, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann,
Heuser, Hildebrand, Hornung, Jakob, Linneweh, Mann,
Martini, Marx, Poetschke, Rohen, Salfeld, Schiff,
Schmid, Schleyer, Schölmerich, Schürmann, Siegert,
Siess, Straub, Streicher, Würtele.

